

Milk culture containing live *Bifidobacterium* and method for manufacturing the culture

Claims

(1) Composition containing live *Bifidobacterium*, which is obtained as a culture by inoculation of *Bifidobacterium* into a milk-based culture medium, characterized in that said composition contains live *Bifidobacterium* and organic acid deriving from lactose which is mainly composed of acetic acid and lactic acid, the molar ratio of acetic acid/lactic acid is 1.7 ± 0.5 and said *Bifidobacterium* is a variant stock capable of growing under aerobic conditions in a genuine milk-based culture medium which does not contain growth promoters.

(2) Dry substance of composition containing live *Bifidobacterium*, which is obtained as a culture by inoculation of *Bifidobacterium* into a milk-based culture medium, characterized in that said composition contains live *Bifidobacterium* and organic acid deriving from lactose which is mainly composed of acetic acid and lactic acid, the molar ratio of acetic acid/lactic acid is 1.7 ± 0.5 and said *Bifidobacterium* is a variant stock capable of growing under aerobic conditions in a genuine milk-based culture medium which does not contain growth promoters.

(3) Composition according to claim 1 or claim 2, characterized in that *Bifidobacterium* is aciduric.

(4) Composition according to claim 3, characterized in that said aciduric *Bifidobacterium* is *Bifidobacterium bifidum* YIT-4005.

(5) Method for manufacturing a milk culture containing live *Bifidobacterium*, characterized in that a variant stock of *Bifidobacterium* is inoculated into a milk-based culture medium to obtain a culture, wherein the variant stock of *Bifidobacterium* is capable of growing under aerobic conditions in a genuine milk-based culture medium which does not contain growth promoters.

(6) Composition according to claim 5, characterized in that said variant stock of *Bifidobacterium* is *Bifidobacterium bifidum* YIT-4005.

(7) Method of manufacturing a beverage made of fermented milk containing live *Bifidobacterium*, characterized in that flavors, fruit juice, water, perfumes, etc., are added to the composition according to one of claims 1 to 4 and the composition is homogenized.

⑩日本国特許庁
公開特許公報

⑪特許出願公開
昭52—83974

⑤Int. Cl. ²	識別記号	⑥日本分類	庁内整理番号	④公開 昭和52年(1977)7月13日
A 23 C 9/00	1 0 2	34 G 0	6904—49	
A 23 C 9/12		34 G 1	6904—49	発明の数 2
A 23 G 9/04		34 G 2	6904—49	審査請求 未請求
A 23 L 2/02		34 G 5	6904—49	
C 12 K 3/00	1 0 1	34 J 123.1	7236—49	
		34 D 1	6712—49	(全 10 頁)
		36(2) B 32	7235—49	

⑤ビフィズス生菌を含有する乳培養物及びその製造法

②特 願 昭51—296
②出 願 昭51(1976)1月1日
⑦発 明 者 務台方彦
東大和市清水4の988
同 馬田三夫
小平市学園東町663の7
同 中島啓

府中市北山町1の7の32
⑦発 明 者 高橋秀世
東村山市青葉町2の2312の171
同 中尾孝
保谷市富士町5の5の24
⑦出 願 人 株式会社ヤクルト本社
東京都港区東新橋1丁目1番19号
⑦代 理 人 弁理士 板井一瑞
最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)
明 細 書

1. 発明の名称

ビフィズス生菌を含有する乳培養物及びその製造法

2. 特許請求の範囲

- (1) 牛乳培地にビフィズス菌を接種培養して得られる培養物であつて、ビフィズス生菌及び主として酢酸と乳酸とからなる乳糖起源有機酸を含有し、酢酸/乳酸のモル比は 1.7 ± 0.5 であり、かつ上記ビフィズス菌は生育促進物質を含有しない純粋牛乳培地で好気的条件下に増殖可能な変異株であることを特徴とするビフィズス生菌を含有する組成物。
- (2) 牛乳培地にビフィズス菌を接種培養して得られる培養物の乾燥物であつて、ビフィズス生菌及び主として酢酸と乳酸とからなる乳糖起源有機酸を含有し、酢酸/乳酸のモル比は 1.7 ± 0.5 であり、かつ上記ビフィズス菌は生育促進物質を含有しない純粋牛乳培地で好気的条件下に増殖可能な変異株であることを特徴とするビフィズス生菌を含有する組成物。
- (3) ビフィズス菌が耐酸性を有するものであることを特徴とする特許請求の範囲第1又は2項記載の組成物。
- (4) 耐酸性を有するビフィズス菌がビフィドバクテリウム・ビ

フィダム YIT—4005であることを特徴とする特許請求の範囲第3項記載の組成物。

- (5) 生育促進物質を含有しない純粋牛乳培地中好気的条件下に増殖可能で耐酸性を有するビフィズス菌変異株を牛乳培地に接種し培養することを特徴とするビフィズス生菌を含有する乳培養物の製造法。
- (6) ビフィズス菌変異株がビフィドバクテリウム・ビフィダム YIT—4005であることを特徴とする特許請求の範囲第5項記載の製造法。
- (7) 特許請求の範囲第1, 2, 3又は4項記載の組成物に、調味料、果汁、水、香料等を加えて均質化することを特徴とするビフィズス生菌を含有する発酵乳飲料の製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、飲食物あるいは飲食物添加物として、広範囲を用いることを有するビフィズス生菌含有乳培養物及びその製造法に関するものである。

ビフィズス菌は、母乳栄養児の腸内細菌叢のほとんどを占める細菌としてよく知られている。この菌の生理的意義に関しては既に多数の研究があり、(1)腐敗菌による腐敗の抑制作用、(2)毒性アミンの産生阻止作用、(3)ホスファoproteinホスファ

ターゼの作用による人乳カゼインの消化作用、(4)乳酸、酢酸、ギ酸等の乳糖起原有機酸の産生にともなう腸管内 pH の低下による病原菌の生育抑制作用、などが明らかにされている。このように乳児にとって有用なビフィズス菌が人工栄養児の場合は非常に少なく、これが母乳栄養児とくらべて腸内疾患にかかりやすい原因の一つと考えられている。そこで、人工栄養児の腸内細菌叢を母乳栄養児のみに変えることを目的として、育児用調製粉乳の母乳化や、ビフィズス菌を含有する育児用粉乳等の乳製品を製造し、投与することが試みられてきた。

しかしながら、牛乳等を培地として培養したビフィズス菌を投与しようとする後者の試みは、次のような問題点に遭遇し、未だ実用化された例はない。すなわち、ビフィズス菌は、牛乳の加工に広く用いられている乳酸菌と比較すると、(1)生育環境として、通常厳格な嫌気条件を必要とする、(2)栄養条件が複雑で、かつ厳格であるため、酵母エキス等の生育促進物質を含有しない純粋な牛乳培地では増殖しない、(3)耐酸性が低いため、発酵乳のような低 pH 領域で長期間生存させることは困難である、などの問題である。牛乳培地にビフィズス菌の生育促進物質を添加すれば好気的条件下でも培養できるが、製品の味や臭いが悪化することが多く、また生育促進物質は一般に高価である

から、実用的ではない。

本発明者らは、以上のようなビフィズス菌培養上の問題点を解決することを目的として種々研究を重ねた結果、好気的条件下、還元剤も生育促進物質もまったく含有していない純粋な牛乳培地で旺盛に増殖するという特異な性質をもつビフィズス菌の存在を知つたのである。

この出願の発明は上記知見に基づくものであつて、上記新たに発見されたビフィズス菌変異株を用いて得られるビフィズス生菌含有組成物及びその製法、更には上記組成物を用いる発酵乳飲料の製造法に及ぶものである。以下順次各発明について説明する。

最初に、本発明において用いるビフィズス菌変異株の性状を、代表的な 1 例 (ビフィドバクテリウム・ビフィダム YIT-4005) について述べる。この菌は、健康な母乳栄養児の糞便から分離されたビフィズス菌を低 pH の緩衝液で数回処理したもののなかから分離されたものである。

①分類学的性状

グラム陽性無芽胞桿菌で、細胞内部にメチレンブルーに親和性を有する顆粒が存在する。顕微鏡で観察すると、細胞の先端が分岐して、Y 字状、湾曲状の多形性を示す。重層法で形成さ

せたコロニーは、円筒状、凸状、レンズ状を示す。12%還元脱脂乳で72時間培養後の酢酸/乳酸の生成モル比は1.78 (1例)であつた。

カタラーゼ活性(-)、ミルク凝固性(+)、セラチン液化性(-)、硝酸塩還元性(-)、インドール産生(-)、硫化水素産生(-)である。

糖発酵性は、グルコース、フラクトース、ラクトース、ガラクトースの各糖が陽性、アラビノース、キシロース、サリシン、マンノース、マンニトール、メレジトース、セロビオース、ソルビトール、イヌリン、トレハロース、ラムノース、マルトース、リボース、ソルボースの各糖が陰性である。

以上の性状から、本菌株は *Bergey's Manual* (1974 年) の分類基準を参照してビフィドバクテリウム・ビフィダムであると同定したが、後に詳述するような、公知のビフィズス菌にはない特性も備えているところから、ビフィダムの変異株であると判断した。

②増殖しうる条件

25~45℃, pH 5~7

(至適条件: 36~38℃, pH 6~7)

③耐酸性

本菌株及び対照としてビフィドバクテリウム・ビフィダム

E319 (以下標準株という) を、嫌気 VL-G 液体培地でそれぞれ 48 時間培養した後、遠沈法により無菌的に集菌、洗浄した懸濁液 (OD 660nm = 1.5) を第 1 表に示すような各 pH の緩衝液 (pH 5.0: 1/100M リン酸緩衝液、pH 5.0~4.0: 1/100M 酢酸緩衝液) に一定量ずつ加え、5℃で保存して生菌数の変化を測定した。

同表から明らかなように、標準株は pH の低下 (特に pH 4.6 以下) にともない、急激に菌数の減少が著しくなるが、本菌株は pH 4.0 付近の低 pH 領域でも非常に安定した菌数を示し、すぐれた耐酸性を有することがわかる。(表中の数値は 1ml 当りの生菌数である。)

第 1 表

pH	菌株	保 存 日 数				
		0	3	5	7	10
6.0	V	4.7×10^4	3.8×10^4	3.7×10^4	4.0×10^4	3.0×10^4
	S	4.5×10^4	3.1×10^4	6.8×10^4	4.2×10^4	2.1×10^4
5.0	V	5.0×10^4	3.8×10^4	2.4×10^4	3.0×10^4	3.3×10^4
	S	4.9×10^4	3.1×10^4	5.5×10^4	1.9×10^4	2.1×10^4
4.6	V	4.2×10^4	5.1×10^4	4.2×10^4	2.0×10^4	9.3×10^3
	S	4.5×10^4	1.0×10^4	3.6×10^4	4.0×10^3	$< 10^3$
4.3	V	4.6×10^4	4.0×10^4	2.1×10^4	6.9×10^3	3.0×10^3
	S	4.2×10^4	3.9×10^4	2.1×10^4	$< 10^3$	$< 10^3$
4.1	V	4.7×10^4	9.5×10^3	3.4×10^4	5.6×10^3	4.3×10^3
	S	4.5×10^4	4.1×10^3	1.0×10^4	$< 10^3$	$< 10^3$
4.0	V	5.0×10^4	7.0×10^3	8.0×10^3	2.8×10^3	2.9×10^3
	S	4.9×10^4	1.2×10^4	$< 10^3$	$< 10^3$	$< 10^3$

※ V : B.ピフィダム YIT-4005

S : B.ピフィダム E319

第 2 表

pH	菌株	保 存 日 数				
		0	3	5	7	10
4.61	V	4.1×10^4	3.1×10^4	2.0×10^4	7.6×10^3	4.3×10^3
	S	6.8×10^4	2.0×10^4	4.3×10^4	6.3×10^3	1.6×10^4
	A	3.3×10^4	5.6×10^3	1.6×10^4	4.3×10^3	2.1×10^4
	B	1.5×10^4	2.7×10^4	6.3×10^3	9.6×10^3	7.7×10^3
	C	8.8×10^4	6.2×10^3	2.5×10^4	5.1×10^3	2.9×10^4
	D	4.3×10^4	7.1×10^3	7.9×10^3	6.3×10^3	4.4×10^3
4.21	V	1.8×10^4	7.6×10^3	9.8×10^3	7.0×10^3	2.4×10^4
	S	2.5×10^4	2.0×10^4	4.5×10^4	$< 10^3$	$< 10^3$
	A	9.9×10^4	7.5×10^3	8.2×10^3	2.3×10^3	$< 10^3$
	B	4.2×10^4	2.5×10^3	4.9×10^3	2.4×10^3	$< 10^3$
	C	2.1×10^4	1.5×10^3	8.7×10^3	$< 10^3$	$< 10^3$
	D	7.7×10^4	2.1×10^3	6.3×10^3	1.5×10^3	$< 10^3$

※ V : B.ピフィダム YIT-4005

S : B.ピフィダム E319

A : B.ピフィダム

B : B.ピフィダム YIT-4002

C : B.ロンガム標準株

D : B.ロンガム

特開 52-83974

同様の傾向は牛乳培地培養物中の菌についても認められる。

第 2 表は酵母エキス粉末 0.3% を添加した 1.0% 還元脱脂乳培地で、培地 pH が同表記載の値になる迄培養したものを急冷して 5℃ で保存した場合の生菌数の変化を示す。

④好気条件での生育性

還元剤や生育促進物質を含有しない 1.2% 還元脱脂乳培地を加熱滅菌後、除菌空気を吸引させながら 37℃ で冷却したものゝに種菌を接種し、同温度で培養を続けた場合の生菌数と酸度（培養液 1.0 ml を中和するのに要する 0.1 N カセイソーダの ml 数で示す）を、比較例と共に第 1 図に示す。図中の記号は第 2 表の菌株のそれと同じである。

同図から明らかなように、本菌株は培養 24 時間以内に、初期菌数 $10^4 \sim 10^5$ / ml のものが 10^8 / ml 以上に達する旺盛な増殖を示す。標準株はこの条件ではほとんど増殖しない。

このような増殖傾向は嫌気条件下でもほとんど変わらない。

以上詳細に説明した本菌株は、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託のため、昭和 50 年 12 月 30 日、東京新橋郵便局より書留郵便（引受番号 473）で郵送した。また前記“③耐酸性”の項で対照例として示した B.ピフィダム YIT-4002 は、耐酸性を有しない以外は同様の性質を有する変異株であつて、同じく寄託のため、昭和 50 年 12 月 30 日、同様に郵送してある（引受番号 474）。

一般的に述べれば、本発明に用いるピフィズ菌としては、前記 B.ピフィダム YIT-4005 と同程度に好気条件下

で増殖しうるものであることが望ましい。耐酸性は、製品の用途によつては必須ではないものの、やはりB・ビフィダム YIT-4005と同等程度であることが望ましい。(少なくとも、前記“③耐酸性”の項で示した緩衝液中の保存試験を行なつた場合に、pH 4.0、7日間の保存後に 10^6 / ml以上の生存菌数を示すものであることが望ましい。)

以上の説明から既に明らかなように、本発明で用いるビフィズス菌は、

- (1) 好気条件下で増殖でき、生育促進物質の添加も不必要であるから、特別の培養法を採用する必要がなく、培養が極めて容易である。
- (2) 添加物による嗜好性の低下を回避することを可能にし、培養物のその後の調味工程を容易にする。
- (3) 培養に余分な添加物を必要としないことは、特に乳児用飲食物(又はそのための添加物)として好ましい。
- (4) 菌が本質的に耐酸性を備え、かつ栄養要求性も単純であるから、培養物(又はその加工物)の保存中の生菌数の低下が少なく、また生菌維持のための条件によつて飲食物等への加工が制限されることが少ない(菌が耐酸菌である場合は特にこの点ですぐれる)。

において、ビフィズス生菌そのものを利用しようとする限り、培養物1 ml中の生菌数は 10^7 以上であることが望ましいが、本発明の培養法によるならば、容易に 10^8 / ml以上の生菌数のものをうることができる。

生存性のすぐれたビフィズス生菌を多量に含有し、ほかに乳発酵分解物、特に特徴的な酢酸や乳酸等からなる有機酸混合物を含有する本発明の培養物は、そのままでも、新しい食品として、あるいは食品添加物として、利用することができる。また甘味料等の調味料、果汁、香料、水等の1以上を適宜配合することにより、新規な発酵乳飲料を製造することができる。培養物を凍結乾燥又は噴霧乾燥したものは、乾燥条件に留意すればなお乾燥物1 g当り 10^8 程度あるいはそれ以上の生菌を含有するから、上記培養物の用途と同じ用途に利用できるほか、取扱容易な粉末状である利点を生かして、更に広範囲な利用が可能である。培養物及びその乾燥物の用途の具体例をあげると、pHが4~7であつて飲食前にビフィズス菌の死滅温度以上に加熱しない飲食物、たとえば牛乳、練乳、粉乳、生クリーム、乳酸菌による発酵乳、アイスクリーム、バター、チーズ、野菜ジュース、果汁、豆乳飲料、マヨネーズ、ドレッシング、ケチャップ、ペースト、ジャム、ふりかけ、その他発酵食品、

このため、本発明によつて、従来公知のビフィズス菌では不可能であつたような培養法による培養が可能となり、また新しいビフィズス生菌含有飲食物の製造が可能となつたのである。

本発明を実施するに当つては、通常の乳酸菌培養と同様の好気培養法を採用することができる。したがつて、乳酸菌との混合培養も可能である。従来ビフィズス菌の培養に際して必ず用いられてきた還元剤や生育促進物質は、本発明の場合、必須のものではない。しかしながら、培養物の利用上障害とならない場合(又は障害とならない範囲で)、生育促進物質等を用いて菌の増殖を助けることはなんら差支えない。

培養に用いる牛乳培地としては、全乳、脱脂乳、これらの粉乳からの還元乳、ボエー等の乳糖含有乳成分からなるもの、又はこれから主としてなるものが用いられる。

通常の培養条件では、培養18~24時間で生菌数が最高に達し、これと並行して酸が生成してpHが低下する。ビフィズス菌特有の酢酸の産生は培養の初期から始まる。したがつて、酢酸/乳酸のモル比は培養中あまり変わらず、 1.7 ± 0.5 である。

更に培養を続けると菌数は減少し始めるが、酸の生成はなおしばらく続いた後、飽和値に達する。したがつて、培養物の用途との関連において適当な段階で、培養を打切る。多くの用途

美容食品等の特殊食品に対して、飲食直前ないし12時間ぐらゐ前に混合するか、これらの飲食物の製造時に混合することにより、風味のすぐれたビフィズス生菌含有食品を得ることができ。また乾燥物は、必要に応じて酵母粉末、クロレラ粉末、糖その他の素材と混合し、更に必要に応じて錠剤化した上で、服用するようにしてもよい。消化剤その他の保健薬素材と配合してもよい。

以下実施例により本発明を説明する。なお、実施例中「変異株」とあるのは、前記ビフィドバクテリウム・ビフィダム YIT-4005をさす。

実施例 1

加熱滅菌後冷却した脱脂乳10 mlに変異株のスターター10%を加え、37℃で5時間培養後、レンネット粉末(3万単位)0.05%を添加してカードを形成させた。カードを細切してからホエーの除去と水洗を行い、12%のクリームを用いて脂肪率が30%になるように調整後、食塩、香辛料、安定剤を添加混合してビフィズス菌含有チーズを得た。製造直後のビフィズス生菌数は 7.6×10^7 / gであり、保存10日目における生菌数は 2.6×10^7 / gであつた。

実施例 2

16%還元脱脂乳を滅菌後、除菌空気を吸引させながら攪拌冷却した培地に変異株スターターを2%接種し、37℃で48時間培養した。培養液525mlと、砂糖80gを含有するシロップ475mlとを混合し、次いで香料を添加してから均質化してビフィズス生菌含有発酵乳を得た。製造直後における製品のpHは4.30、生菌数は 3.6×10^8 /ml、保存7日目における生菌数は 4.9×10^8 /mlであつた。

実施例 3

牛乳に脱脂粉乳を加えて乳固型分濃度が16%になるよう調整した培地を滅菌後、ラクトバチルス・アシドフィルス菌のスターター5%、変異株のスターター1%をそれぞれ添加し、37℃で20時間混合培養した。次いで培養液525mlを、果汁（バナナ果汁/ミカン果汁=3/1）200ml、砂糖60gを含むシロップ475mlと混合し、香料を加えて均質化した。得られたビフィズス生菌含有果汁入り発酵乳のpHは4.40、ビフィズス生菌数は 2.6×10^8 /ml、アシドフィルス生菌数は 4.8×10^8 /mlであり、保存7日目のビフィズス生菌数は 6.8×10^8 /ml、アシドフィルス菌のそれは 2.0×10^8 /mlであつた。

と同様にして発酵乳を製造した。製品の特性値は第3表のとおりであつた。

これらの製品について、風味の官能検査を行なつた結果を第4表に示す。同表から明らかなように、生育促進物質無添加の製品の評価は著しく高く、他のものと有意な差があつた。

第3表

生育促進物質	濃度	pH	生菌数/ml
なし	7.0	4.75	1.5×10^8
ペプトン 0.5%	8.0	4.55	2.0×10^8
OSL 1.0%	7.2	4.60	1.6×10^8
酵母エキス 0.3%	7.0	4.75	2.5×10^8

実施例 4

脱脂大豆粉末70g、牛乳ホエー粉末30g、乳糖10gに水を加えて1Lとし、滅菌後、変異株のスターター5%を接種し、37℃で72時間培養した。次いで培養液500mlと、砂糖60g、ソルビトール50gを含むシロップ500mlとを混合し、香料を加えてから均質化してビフィズス生菌含有発酵豆乳を得た。製造直後の製品pHは4.3、生菌数は 1.6×10^8 /mlであり、保存6日目の生菌数は 3.8×10^8 /mlであつた。

実施例 5

脱脂粉乳100gを水900mlに溶解した滅菌培地に変異株スターター2%を加え、37℃で24時間培養した。培養終了時の生菌数は 2.8×10^8 /ml、酸度10.5、酢酸/乳酸のモル比は1.7であつた。

培養液を取り出してそのまま凍結させ、2mmHg以下の減圧下で約7時間乾燥した。乾燥物105gが得られ、この中のビフィズス生菌数は 5.5×10^8 /gであつた。

実施例 6

16%還元乳培地、及びこれに生育促進物質として、①ペプトン、②OSL、③酵母エキスを添加した培地に、変異株スターターを2%加え、37℃で15時間培養したものから実施例2

第4表

生育促進物質		風味の評価	
なし		+0.3	～ 1.3
ペプトン		-1	～ 0
OSL		-0.5	～+0.4
酵母エキス		-1	～+0.1

有意差検定					
要因	平方和	自由度	不偏分散	F ₀	危険率
主効果	46042	3	15347	24.444	1%以下
組合せ効果	0291	3	0097	0.155	—
順序効果	32000	6	5333	8.494	1%以下
誤差	37667	60	0628	—	—

※ -1: ややまずい 0: どちらでもない

+1: ややおいしい +2: かなりおいしい

試験方法

Scheffeの1対比較法で4種類の試料2つずつ、12とおりの組合せを作り、供試した。パネル数は36名である。

実施例 7

酵母エキス粉末3%、コーンステープリカー5%、クエン酸0.5%、硫酸0.5%、乳糖1%、システイン塩酸塩0.03%の組成を有するpH 6.8の培地を用い、変異株のスターター3%を接種し、37℃で72時間培養した。この培養液を遠沈し、得られた菌体を、脱脂乳のプロテアーゼ分解物5%、砂糖5%、ビタミン0.1%を含有する水中に懸濁させて凍結乾燥を行なった。

得られた菌体乾燥粉末を、殺菌した牛乳に2%添加し、均質化してから容器に充填してビフィズス菌含有牛乳を得た。製造直後における生菌数は 4.6×10^8 / ml、保存6日目のそれは 2.2×10^8 / mlであつた。

実施例 8

脂肪率40%の生クリーム7kg、全脂加糖練乳20kg、牛乳64L、脱脂粉乳2kg、砂糖6kg、安定剤0.3kgに水を加えて150Lにし、加熱殺菌後均質機にかけ、40℃以下に冷却してから、実施例7で製造した菌体乾燥粉末を1%添加混合し、カップに充填後-20℃で硬化させ、ビフィズス菌含有アイスクリームを得た。生菌数は 3.0×10^8 / ml、保存3ヶ月目の生菌数は 2.2×10^8 / mlであつた。

実施例 9

ニンジン130g、トマト100g、セロリー3g、キャベツ100gを小さく切断し、水500mlを加えて鍋の中で沸騰させ、ミキサーで破砕後、布で濾過して野菜汁を調製した。この野菜汁100ml当りクロレラ粉末10g、食塩0.5g、香辛料0.1g、実施例7で製造した菌体乾燥粉末1gを添加してビフィズス菌含有野菜汁製品を得た。ビフィズス菌数は 2.8×10^8 / ml、保存10日目のそれは 6.5×10^7 / mlであつた。

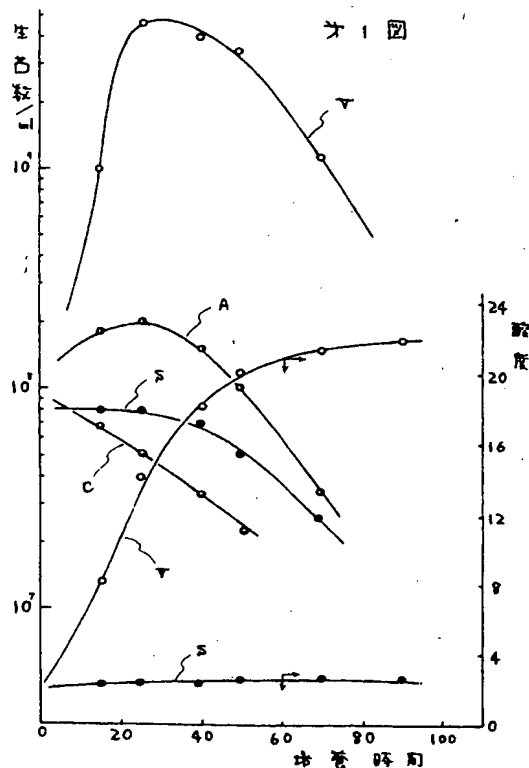
実施例 10

全脂粉乳を用いて育児用粉乳を調製し、この粉乳100g当り5gの菌体乾燥粉末(実施例7による)を混合して窒素ガス充填を行い、ビフィズス菌含有育児用粉乳を得た。生菌数は 1.0×10^8 / g、3ヶ月保存後のそれは 5.1×10^7 / gであつた。

4. 図面の簡単な説明

第1図はビフィズス菌の培養中の生菌数と酸度の変化を示すグラフである。

特許出願人 株式会社ヤクルト本社
代理人 弁理士 板 井 一 雄



第1頁の続き

②発明者 島田清弘
国立市谷保5863の2
飯島隆
国立市東1の10の20

手続補正書(自発)

昭和51年2月18日

特許庁長官 片山石郎 殿

1. 事件の表示
昭和51年特許願 第000296号
2. 発明の名称 ビフィズス生菌を含有する乳培養物及びその製造法
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
住 所 東京都港区東新橋1丁目1番19号
氏 名 株式会社 ヤクルト本社
代表者 代 田 稔
4. 代 理 人
住 所 東京都港区北青山3の6の18共同ビル7階
氏 名 (6742) 板 井 一 瑞
5. 補正命令の日付
6. 補正により増加する発明の数
7. 補正の対象 明細書全文
8. 補正の内容
別紙のとおり(出願時の明細書をタイプ浄書したものであつて内容に変更はない)

補正明細書。以下の各項において同じ) 第10頁第13行～14行の「寄託のため、……(引受番号473)で郵送した。」を「微工研菌寄第3372号により寄託済である。」と補正する。

(2)同第10頁第17～18行の「寄託のため、……(引受番号474)。」を「微工研菌寄第3371号により寄託済である。」と補正する。

(3)同第12頁第13行の「用いらる。」を「用いられる」と補正する。

(4)同第14頁下より第3行の「ビフィズ」を「ビフィズス」と補正する。

9. 添付書類の目録

- | | |
|--------------------|----|
| (1)微生物保管委託申請書受理番号票 | 2通 |
| (2)微生物受託番号通知書 | 2通 |

特開昭52-83974(7)

手続補正書

昭和51年6月10日

特許庁長官 片山石郎 殿

1. 事件の表示
昭和51年特許願 第296号
2. 発明の名称 ビフィズス生菌を含有する乳培養物及びその製造法
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
住 所 東京都港区東新橋1丁目1番19号
氏 名 株式会社 ヤクルト本社
代理人 代 田 稔
4. 代 理 人
住 所 東京都港区北青山3の6の18共同ビル7階
氏 名 (6742) 板 井 一 瑞
5. 補正命令の日付
6. 補正により増加する発明の数
7. 補正の対象 明細書の発明の詳細な説明の欄
8. 補正の内容
(1)明細書(昭和51年2月18日付手続補正書による発文)



手続補正書(自発)

昭和52年8月31日

特許庁長官 片山石郎 殿

1. 事件の表示
昭和51年特許願 第296号
2. 発明の名称
ビフィズス生菌を含有する乳培養物及びその製造法
3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
住 所 東京都港区東新橋1丁目1番19号
氏 名 株式会社 ヤクルト本社
代表者 代 田 稔
4. 代 理 人
住 所 東京都港区北青山3の6の18共同ビル7階
氏 名 (6742) 板 井 一 瑞
5. 補正の対象
願書及び明細書の発明の名称の欄。
明細書の発明の詳細な説明の欄
及び特許請求の範囲の欄
微生物保管委託申請書受理番号票。

6. 補正の内容

- (1) 願書及び明細書(昭和51年2月18日付手続補正書による全文補正明細書。以下の各項において同じ。)の発明の名称の欄記載の発明の名称を「ビフィドバクテリウム^{バイデン}生菌を含有する培養物及びその製造法^{バイデン}」と補正する。
- (2) 明細書第2頁第15行の「ビフィズス生菌含有」を「ビフィドバクテリウム菌(以下ビフィズス菌という)の生菌を含有する」と補正する。
- (3) 同第5頁第4行の「カタラーゼ活性(-)」、「の後に「炭酸ガス産生(-)」を加入する。
- (4) 同第10頁第1行の「好気」を「好氣的」と補正する。
- (5) 同第11頁第9~10行の「好気条件下でも増殖でき、生育促進物質の添加も不必要であるから、特別の」を「生育促進物質を全く含有しない純粋な牛乳培地中で好氣的条件下でよく増殖するので、培養にあたって換気」

と補正する。

- (6) 同第12頁第1~2行の「不可能であったような培養法」を「増殖できないといわれていた純粋な牛乳培地」と補正する。
- (7) 同第12頁第4行の「通常の乳酸菌培養と同様の好気」を「酪農乳酸菌の培養と同様な条件の」と補正する。
- (8) 同第15頁第4行の「培養液」を「得られた培養液(酸度20.64、生菌数 5.2×10^8 / ml、酢酸/乳酸のモル比1.55)」と補正する。
- (9) 同第18頁第4表におけるF₀の欄中、「24.444」を「24.444^{***}」と補正する。
- (10) 同上F₀の欄中、「8494」を「8.494^{***}」と補正する。
- (11) 同上応検率の欄を削除する。
- (12) 同第18頁下より第4行と下より第8行の間に「***: 危険率1%以下で有意差あり」を加入する。
- (13) 同第20頁第15行と第16行の間に下記の文を加入する。

実施例11

脱脂粉乳160gを水道水で溶解して1ℓとし、100℃で80分間加熱殺菌する。冷却後、あらかじめ純粋培養しておいたビフィドバクテリウム・ビフィダムYIT-4002のスターターを2g添加し、87℃で16時間培養する。得られた培養液は、酸度10.7、生菌数 8.6×10^8 / ml、酢酸/乳酸のモル比1.65であった。この培養液525mlと、砂糖85g、ソルビトール85gを含むシロップ475mlとを混合し、香料を添加してから均質化して製品とする。製品の酸度7、pH4.7、生菌数 2.9×10^8 / mlであった。

実施例12

脱脂粉乳160gを水道水で溶解して1ℓとし、120℃で15分間加熱殺菌後冷却して得られた培地に、あらかじめ純粋培養しておいたビフィドバクテリウム・ブリーベYIT-4006(微工研研寄受理第8906号)のスターターを2g接種し、87℃で20時間、好氣的条件下で培養した。得られた培養物は酸度11.5、生菌数 2.2×10^8 / ml

であった。

次いで上記培養物550mlと蔗糖80g、ソルビトール80gを含むシロップ450mlとを混合し、ニンジンジュース5gを添加してから均質機で均質化して発酵乳飲料を得た。製品の酸度6.5、生菌数 7.5×10^8 / mlであった。

〔ビフィドバクテリウム・ブリーベYIT-4006の主要菌学的性状〕

YIT-4006は健康な母乳栄養児の糞便から分離されたビフィドバクテリウム菌を低pHの培養液で数回処置したものの、中から分離されたものであって、その菌学的性状は次のとおりである。

①分類学的性状

グラム陽性無芽胞桿菌で、細胞内部にメチレンブルーに親和性を有する顆粒が存在する。顕微鏡で観察すると、棍棒状の短桿菌で、しばしば分枝したものが認められる。コロニーは円筒状、凸状、レンズ状を示す。12g還元脱脂乳で培養すると、乳酸と等モル以上の酢酸を産生

(至適条件: 86~88℃、pH 6~7)

する。

カタラーゼ活性(-)、炭酸ガス産生(-)、^{(ミルク凝固性(+))}ゼラチン液化性(-)、硝酸塩還元性(-)、インドール産生(-)、硫化水素産生(-)である。

糖発酵性は、グルコース、フラクトース、ラクトース、ガラクトース、サリシン、メレシトース、セロビオース、^(リボース)マルトース、マンノースの各種が陽性、アラビノース、キシロース、マンニトール、ソルビトール、イヌリン、トレハロース、ラムノース、ソルボースの各種が陰性である。

以上の性状から、YIT-4006は、Bergey's Manual第8版(1974)の分類基準を参照して、ビフィドバクテリウム・フリーベであると同定したが、後に詳述するように、公知のビフィドバクテリウム菌にはない特性も備えているところから、上記種の変異株であると断定した。

② 増殖しうる条件

25~42℃、pH 5~9

第5表

菌 株	培養時間(h)	生菌数 / ml	酸 度
YIT-4006	0	7.0×10^7	3.4
	17	1.2×10^8	10.0
	24	8.9×10^8	13.5
	41	5.6×10^8	17.0
標準株	0	4.0×10^7	3.6
	17	5.1×10^7	6.7
	24	3.6×10^7	7.8
	41	1.1×10^7	9.2

00 特許請求の範囲を別紙記載のように補正する。

03 別紙ビフィドバクテリウム・フリーベ YIT-4006の「微生物保管委託申請書受理番号票」を提出する。

③ 好氣的条件での生育性

還元剤や生育促進物質を含有しない16多還元脱脂乳150mlを800ml容量の三角フラスコに注入し、稀塩を加えてから120℃で15分間滅菌した後、廃水中で87℃まで攪拌冷却した培地にスターターを2%重量比で87℃で静置培養した場合の生菌数と酸度を比較例(標準株)と共に第5表に示す。

同表から明らかなように、本菌株は培養24時間以内に初期菌数 $10^7 \sim 10^8$ / mlのものが 10^9 / ml以上に達する旺盛な増殖を示す。これに反して標準株はこの条件ではほとんど増殖しない(上記培養条件は、発酵乳、チーズ、乳酸菌飲料の製造に用いられるいわゆる酪農乳酸菌の基本的な培養条件と同じである。))。

特許請求の範囲

- (1) ビフィドバクテリウム菌を培養して得られる培養物であって、ビフィドバクテリウム生菌及び主として酢酸と乳酸とからなる乳糖起源有機酸を含有し、酢酸/乳酸のモル比は 1.7 ± 0.5 であり、かつ上記ビフィドバクテリウム菌は生育促進物を含有しない純粋牛乳培地で好氣的条件下に増殖可能な変異株であることを特徴とするビフィドバクテリウム生菌を含有する組成物。
- (2) ビフィドバクテリウム菌が耐酸性を有するものである特許請求の範囲第1項記載の組成物。
- (3) 耐酸性を有するビフィドバクテリウム菌がビフィドバクテリウム・ビフィダム YIT-4005である特許請求の範囲第2項記載の組成物。
- (4) ビフィドバクテリウム菌がビフィドバクテリウム・ビフィダム YIT-4002又はビフィドバクテリウム・フリーベ YIT-4006である特許請求の範囲第1項記載の組成物。
- (5) ビフィドバクテリウム菌を培養して得られる培養物の乾燥物であって、ビフィドバクテリク

加入/字

た、い、か

△生菌及び主として酢酸と乳酸とからなる乳糖起源有機酸を含有し、酢酸／乳酸のモル比は 1.7 ± 0.5 であり、かつ上記ビフィドバクテリウム菌は生育促進物質を含有しない純粋牛乳培地で好氣的条件下に増殖可能な変異株であることを特徴とするビフィドバクテリウム生菌を含有する組成物。

(6) ビフィドバクテリウム菌が耐酸性を有するものである特許請求の範囲第5項記載の組成物。

(7) 耐酸性を有するビフィドバクテリウム菌がビフィドバクテリウム・ビフィダムYIT-4005である特許請求の範囲第6項記載の組成物。

(8) ビフィドバクテリウム菌がビフィドバクテリウム・ビフィダムYIT-4002又はビフィドバクテリウム・フリーベYIT-4006である特許請求の範囲第5項記載の組成物。

(9) 生育促進物質を含有しない純粋牛乳培地中好氣的条件下に増殖可能で耐酸性を有するビフィドバクテリウム菌変異株を牛乳培地に接種し培養することを特徴とするビフィドバクテリウム

生菌を含有する乳培養物の製造法。

00 ビフィドバクテリウム菌変異株がビフィドバクテリウム・ビフィダムYIT-4005である特許請求の範囲第9項記載の製造法。

01 牛乳培地にビフィドバクテリウム菌を接種培養して得られる培養物であって、ビフィドバクテリウム生菌及び主として酢酸と乳酸とからなる乳糖起源有機酸を含有し、酢酸／乳酸のモル比は 1.7 ± 0.5 であり、かつ上記ビフィドバクテリウム菌は生育促進物質を含有しない純粋牛乳培地で好氣的条件下に増殖可能な変異株であるものを、調味料、果汁、水又は香料の1種以上と共に均質化してなるビフィドバクテリウム生菌を含有する発酵乳飲料。

02 ビフィドバクテリウム菌がビフィドバクテリウム・ビフィダムYIT-4005である特許請求の範囲第11項記載の飲料。

03 ビフィドバクテリウム菌がビフィドバクテリウム・ビフィダムYIT-4002又はビフィドバクテリウム・フリーベYIT-4006である特許

請求の範囲第11項記載の飲料。